

粗酵素液の酸素消費測定に関する検討

海 藤 是 夫

生命活動を支える基本的過程を触媒している酵素について、その特性と生理的意味とを関連づけ、より具体的、効果的な指導をすることが必要であるとの考えから、特にガスの吸収、発生をおこなう無細胞系を選び、高等学校における生徒実験による定量測定の可能性を検討したものである。本実験の特色は、ガス測定装置として小林の装置の活用をはかっていることである。この装置により、ミトコンドリア分画のクレブス回路、電子伝達系の呼吸酵素系と、D- α -アミノ酸酸化酵素系とによる酸素消費を測定し、各系のかなり微量なガス収支の変化量を比較的容易に得ることができることを報告している。

1 はじめに

高等学校生物実験では、酵素の性質を理解するための実験が、いろいろくふうされているが、筆者は特に、定量化された資料に基づき、酵素の特性やその生理的意味をより具体的に追求し得る生徒実験の必要性を考えて、酵素作用による酸素消費測定実験の検討を試みた。

異化過程を代表する呼吸に関して、ミトコンドリアに組みこまれているクレブス回路や電子伝達系は今後、主として生物Ⅰで、そして生化学的により深く生物Ⅱで学習がなされるが、これらの系は教科書で模式的に学習されることが多いと想像される。自作可能で、多数を揃えることのできる測定装置を使って、ミトコンドリア分画の酸素消費を実験的に確かめることができれば、呼吸酵素系作用の理解を一層深めることができよう。

また呼吸系以外で酸素消費に関係するオキシダーゼ類のうち、D- α -アミノ酸酸化酵素を選び、同じく酸素消費を定量することにより、その酵素活性を知り、酵素作用の一般的理解を得ようとする実験の可能性を検討した。以上のように、本報告は、ここで使用した小林の装置により、どの程度までデータが得られ、どの程度までそれをもとにして議論が進め得るかを追求しようと意図したものである。

この実験を実施するにあたり、いろいろ御教示いただいた新潟大学、清水泰二教授に深く御礼を申し上げます。

2 ガス測定装置について

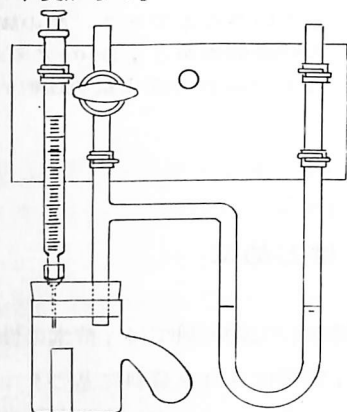
ガスの発生、吸収を定量するために、従来多くの自作装置が考案され、実験に使われてきている。これらの装置は、その測定原理の点から大きく二つの系統に分けられるようである。¹⁾ 篠原によれば、一つは検圧計の変化を読みとる方式をもつものであり、他の一つは、検容計の閉塞液滴の移動よりガスの変化量を直読する方式をもつものである。さらに検容計を利用したものの中には、上述の直読方式でなく反応容器部の容量を変化させることにより、液滴を基準位置に戻し、容器部の変化容量を読む方式をも

つものが含まれる(プロダクトメーター, 杉山式簡易プロダクトメーター¹⁾)。

ワールブルグ検圧法の場合のように, 容器恒数を求めるものは別として, 検圧計の変化を直読する方式はガス変化量を原理的には正しく読みとり得ないという欠点をもっているが(竹内²⁾), 簡明であることより使いやすい利点をもっている。これに対して検容計を組みこんだものは, 原理的には正確に変化量を直読できる優れた点をもっているので大いに活用し得るものである。しかし実際に使用してみると液滴部が滑らかに動くよう保守することにトラブルが生じやすい。また反応容器と対照容器を一体としたプロダクトメーター方式では, 多数の実験を同時におこなえない不便がある。

筆者は小林が記載している装置に興味をもち, 高等学校の生物実験装置として優れているものと判断して, これの活用を試みた。これは原理的にはプロダクトメーターと同じ容量計方式である。以後これを小林の装置と呼ぶ。この装置の利点としては次の点があげられよう。

・容易に自作可能であること: 筆者の使用した装置は図1のものであるが, マノメーター部とコック部を分離して別々にゴム栓に挿入しても同じである。コック部はコックのかわりにゴム管とピンチコックでよい。容器はプラスチック標本瓶(50~100mlなど)が使える。



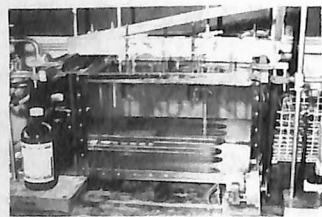
(図1) 小林の装置

・マノメーター部について: 注射筒内の容量を変化させて液柱を実験開始位置へ戻す方式であるためガラス管の内径, および内径のゆがみなどを考慮する必要がない。また検容計を組みこんだ装置ではよくあることだが, 液滴の動きが悪くなったり, 液滴をうっかりとばしてしまったりするトラブルはまったくなく, 一度着色液を入れると長期間にわたって使用にたえ, 保守に手数がかからない。

・容量計であること: 容器内ガス変化が外に対する圧変化としてマノメーター部にあらわれるが, 液柱が測定開始時の状態になるまで注射器の容量を変え, 注射器の目盛りを直読して変化容量を知る方式である。圧変化量を容量に換算する計算を必要としない。1CC用ツベルクリン注射器を使った場合, 1CCを50等分して目盛りされており, 最小目盛りの中間点まで読み得るから, 10 μ lのオーダーでデータをとることができる(ただし1CCを1mlとして)。

・補正をおこなう温圧計も含めて, 装置を同時に多数並べて測定できること。……等である。

＜小林の装置の組立てと測定法＞ マノメーター部に着色液を入れ, 液柱の上端に基準線を記入しておく。ゴム栓に輸血用注射針(中)をさしこむ。注射器はツベルクリン用の最小容量1ml用が適当である。フラスコはガラス製で, 側室, センターウェル付きのものを作製した。容量はゴム栓をした場合で約30mlである。装置全体は5mm厚プラスチック板にとりつけ, 振とうのため図2のような木製支持器にプラスチック部を蝶ねで固定した。振とうにはプロダクトメーター用のモーターを利用した。



(図2) 実験装置

37℃の恒温水槽中に装置を沈め, 温度平衡に達するまで15分

間空振りを必要とした。側室中のメジウムを主室に注ぐ場合は、10分後に混合し、その後5分間活栓を開いたまま空振りを続けてから測定した。測定中の水温、気圧の変化による容量変化を補正するため、温圧計をもちいた。温圧計のフラスコは、あらかじめ容量を測定しておき、反応フラスコとほぼ等量になるようにゴム栓をセットし、温圧計、反応フラスコとも空の状態であらかじめ一致した容量変化することを確認めた。容器中でガス吸収がおこっている場合は、それによる減圧分だけ液柱が容器側に引かれるから、注射器のピストンを下げて液柱を実験開始時の基準線までもどし、それに要した容量を注射器の目盛りから読みとった。測定値の読みとりは10分間隔でおこない、温圧計による補正をおこなった。本実験中のデータはすべて37℃における数値である。

3 実 験

(1) マウス肝ミトコンドリア分画の酸素消費について

脱水素反応をうけた基質より離脱した水素はミトコンドリア中で、電子伝達系を経由しながらエネルギーを放出し、最終的にはチトクロームオキシダーゼにより触媒されて、分子状酸素と結合して水となる。したがって系の最終段階で酸素消費がおこっている。細胞構成粒子であるミトコンドリアを含む分画が酸素を消費していることを実際に測定することは、生徒にとって大きな驚きとなるであろうし、呼吸とそれを触媒する酵素系に関する原理的理解が深められるであろう。従来、クレブス回路の各種基質の酸化にともなう酸素消費は、ワールブルグ検圧計をもちいて詳細に研究されてきたが、本実験では、簡易な装置で測定を試み、実験目的が達せられることを明らかにしようとした。

ミトコンドリア分画も純粹にするには高速冷凍遠心機を必要とするが、ここでは600G以上程度をだせる普通の遠心機で調製できる粗ミトコンドリア分画を主としてもちいた。

a 材料と方法

dd-マウスを使用。断頭、放血後に肝臓を摘出、氷冷した0.25Mショ糖液中にてよく洗浄し、冷凍庫中に保存した。

＜ミトコンドリア液の調製＞ 塩酸でpH 7.4に調整した0.25Mショ糖-5mMトリス液を、ホモジナイザー(Potter-Elvehjem 20 ml用)に試料とともにその10倍量加えてホモジナイズした。この10%ホモジネイトを600G、10分間遠心し、上清を取り粗ミトコンドリア液とした。浮いた脂質は注意深く除いた。

精製ミトコンドリア分画を得るため、粗ミトコンドリア分画をさらに8,000Gで10分間冷凍遠心し、これをもう一度くりかえして精製分画とした。

＜反応容器の調製＞ 主室には実験目的に応じて、粗または精製ミトコンドリア液を4ml、アジ化ナトリウム(NaN_3)溶液各濃度とも0.5ml、0.05%メチレンブルー溶液0.1ml、総液量調整のため蒸留水を入れた。側室には実験目的に応じて、0.5Mコハク酸ナトリウム溶液、0.5Mマロン酸ナトリウム溶液、0.5Mリンゴ酸溶液(NaOHでpH7.4に調整したもの)を入れた。センターウェルには20%KOHを0.3ml使用した。なお反応溶液の総量はすべて5mlとした。

b 結果と考察

＜コハク酸酸化にともなう酸素消費について＞ 終濃度 5×10^{-2} Mコハク酸を基質とし、発生 CO_2 を KOH にて吸収した場合の粗ミトコンドリア液による酸素消費のようすは、材料の個体差によりおよそ $\pm 8 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ 程度の範囲で変動があるので、そのうちの1例を図3グラフAで示した。この場合の見かけ上の酸素消費速度は測定後約40分までは約 $70 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ であるが、それ以後は約 $60 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ であった。基質添加しない場合、この分面の示す内在酸素消費はグラフBのごとく、測定後およそ40分までは $30 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ の値をもっている。しかしこれは種々な内在基質が消費されるにしたがって、間もなく急速に低下していく。

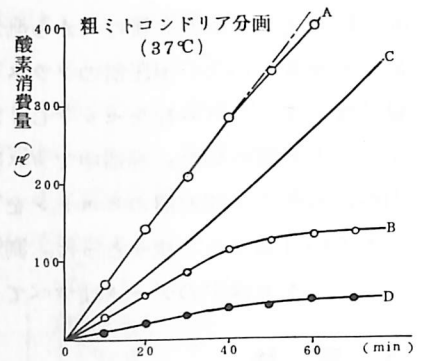
40分以後、グラフAの勾配が減少していくことは、この時期を境に内在性酸素消費が減少したためと考えられる。もしコハク酸添加した場合でも内在酸素消費がグラフBのように進行しているとするならば、グラフA, Bを比較することにより、コハク酸の正味の酸化による酸素消費量がその差としてグラフCのように得られよう。

グラフCは大きく二つの相よりなっていると考えられる。勾配の小さい初期の相は、この分面内の系でかなり大きな内在酸素消費をおこなっているため、コハク酸酸化系が相対的に抑えられていることを推定させるものである。これが時間の経過にしたがって、内在酸素消費の減少にともない、コハク酸酸化酵素系が充分にはたらく相へと移行していくものと解釈される。すなわち40分値以後のグラフAとCとの勾配がほぼ等しくなることは、内在酸素消費がほとんどゼロに近づき、コハク酸酸化による酸素消費のみおこっていることを示している。

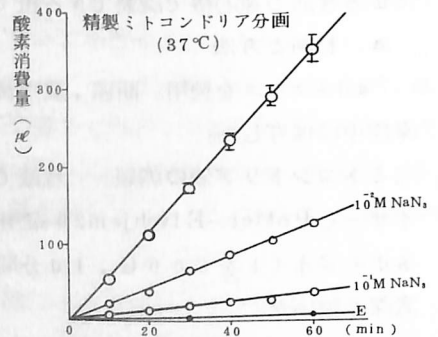
精製ミトコンドリア分面では同じ条件で、図4のような酸素消費を示し、その値は約 $60 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ であった。この分面では内在酸素消費(グラフE)は約 $1.7 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ 程度でほとんど無視できるので、このグラフそのものがおよそコハク酸酸化による酸素消費を示していると考えてよい。粗ミトコンドリア分面の正味のコハク酸酸化の後期の相の勾配は、精製ミトコンドリア分面の示すそれとおおよそ等しかった。

コハク酸のフマル酸への酸化はFADを補酵素とするコハク酸脱水素酵素により触媒されるが、チトクロームcまでは一つのユニットとしてコハク酸酸化酵素系をなしている。したがって、これまで示した値はコハク酸酸化酵素系の活性をあらわしている。しかしこの系では、先頭のコハク酸脱水素酵素が律速段階をなしていると考えられることから、これらの酸素消費はコハク酸脱水素酵素活性をあらわすとしてよいと思われる。

図3, グラフDは CO_2 吸収しなかった場合の内在酸素消費を調べた結果である。グラフB, Dより内在的に発生した CO_2 量を求めることができる。その値は40分付近までは約 $25 \mu\text{l}/10 \text{ min}$ であった。精製ミトコンドリア分面における CO_2 発生は、小林の装置で確認できる程度はなかった。



(図3)



(図4)

粗ミトコンドリア分画を使って実験する場合は、種々な基質が含まれているため、あらかじめ内在酸素消費量を確かめておくことと、 CO_2 発生がかなりあるため、消費酸素量を発生 CO_2 で相殺しないよう、 CO_2 吸収剤をもちいることなどが必要であろう。なお内在性ガス収支は、マウスの飢餓の程度により変動するであろう。

<アジ化ナトリウムによる阻害について> 一般にアザイド(窒化物)はシアン化物と同様、生体中で金属との親和力が大きく、特に鉄ポルフィリン酵素類を阻害することが知られている。ミトコンドリア系では、電子伝達の最後に位置するチトクロームオキシダーゼ活性を阻害し、したがって酸素消費が減少することになる。

CO_2 を吸収し、終濃度 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ のコハク酸を基質として、終濃度それぞれ 10^{-1} M , 10^{-2} M , 10^{-4} M の NaN_3 を添加した場合の粗ミトコンドリア液による酸素消費の結果は図5のようであった。対照(破線グラフ)とくらべて、内在酸素消費も含めた全酸素消費に対するその阻害効果は明らかであった。

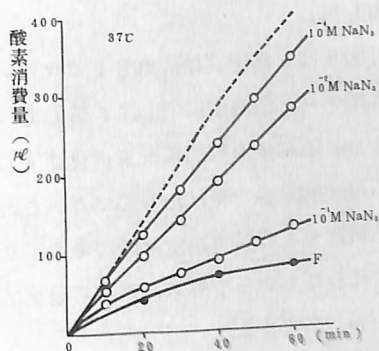
精製ミトコンドリア液では同一条件で、図4で示したようにその阻害効果は、 10^{-2} M で約40%, 10^{-1} M で約10%であった。この値は、概ね、コハク酸酸化系経由による酸素消費の阻害をあらわしているといえよう。

図5グラフFで、内在酸素消費分に対する終濃度 10^{-1} M の NaN_3 阻害効果を示した。これは約60%に阻害された。一方同時に、これとほぼ等量の CO_2 を発生していることが確かめられるので、脱炭酸酵素類による内在性 CO_2 発生は、この条件で酸素消費系ほどには阻害されないと推定できた。

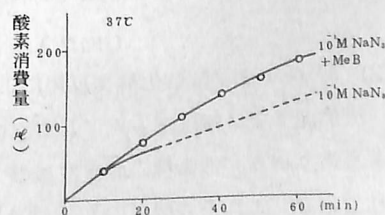
粗ミトコンドリア分画で、コハク酸添加時の 10^{-1} M 阻害と
同じ条件での内在酸素消費との比較により、コハク酸酸化系経由分に対する阻害酸素消費量がわかり、この値は 10^{-1} M 阻害精製ミトコンドリア分画のそれとほぼ等しく、 $5 \sim 7 \mu\text{L}/10 \text{ min}$ 程度であった。

<アジ化ナトリウム阻害に対する添加メチレンブルーの効果> 生体にとって比較的毒性の少ない色素であるメチレンブルー(MeB^+)は $\text{pH} 7.0$ でほとんどゼロに近い標準酸化還元電位をもっており、したがって負の酸化還元電位を有する系によって還元されロイコ型メチレンブルー(MeBH)となる。電子伝達系と MeB^+ が共存した場合で、チトクロームオキシダーゼ阻害がある時は、還元型フラビンにより MeB^+ が還元され、次いで MeBH が分子状酸素と反応して過酸化水素を自動的に生成する。カタラーゼが存在する場合は、過酸化水素を分解して酸素を発生するため、結局見かけ上、 $1/2$ 量の酸素消費がみられることになる。

終濃度 10^{-1} M の NaN_3 でチトクローム系を阻害しておき、水素受容体として終濃度 $10^{-3} \%$ メチレンブルーを添加して得られた結果は図6のグラフである。メチレンブルーなしの同濃度阻害(破線グラフ)と比較すると明らかに酸素消費の増加を示している。



(図5)



(図6)

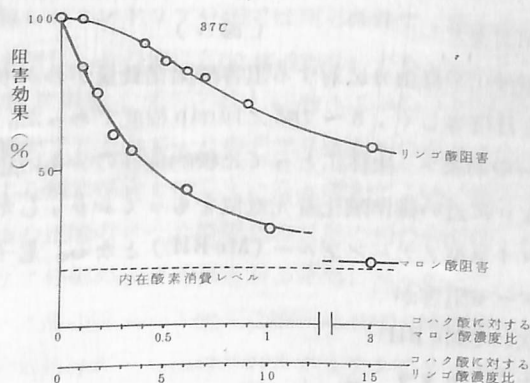
NaN_3 は反応性の高い物質であり、メチレンブルーと複塩を形成する可能性がある。もしこれがかなりの程度におこるなら、それに応じて溶液中のフリー NaN_3 の濃度は低下するであろう。このことはフリーの NaN_3 を直接測定しない限りわからない。筆者はこの測定をやっていないので、前記メチレンブルー効果が、実際にメチレンブルーの電子伝達系代替の結果なのか、あるいは NaN_3 濃度低下による阻害作用そのものの減少した結果であるのか、ここでは断定することができない。

測定開始後10分位まで、反応容器内のメチレンブルーは青色から明らかに褪色していくのが観察される。その後徐々にまた青色に復していく。この現象から考えると、メチレンブルーを介した酸素消費が含まれていることは事実であろう。しかしその量的関係はこの実験のみでは把握できなかった。

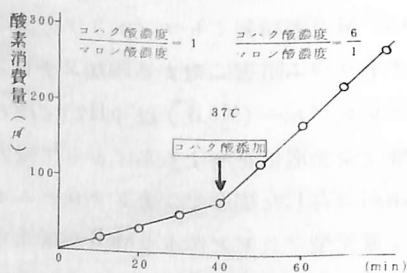
＜マロン酸、及びリンゴ酸による競合阻害効果＞ コハク酸濃度に対するマロン酸、リンゴ酸濃度をいろいろ変えて、粗ミトコンドリア分画の酸素消費量の変化を調べた結果を図7に示した。

コハク酸酸化酵素系に於けるマロン酸の阻害効果は、リンゴ酸のそれに比して大きいことがわかった。コハク酸濃度の3倍のマロン酸濃度は、概ね、内在酸素消費のレベルまでコハク酸酸化酵素系を阻害した。

図8は、測定開始後40分までマロン酸に対するコハク酸濃度比を1とした酸素消費速度をプロットし次にマロン酸濃度に対して6倍濃度になるようコハク酸添加して、酸素消費速度の変化を調べた結果である。添加後直線的に酸素消費速度の増大がみられたことより、コハク酸脱水素酵素はマロン酸により不可逆的阻害を受けたものでないことが読みとれよう。マロン酸、リンゴ酸ともコハク酸によく似た分子構造をもつジカルボン酸である。この実験結果より、対コハク酸濃度比にしたがった可逆的阻害がみられることから、酵素に対する確率的出会いによる阻害である競合(拮抗)阻害を理解させる事例とすることができよう。



(図7)



(図8)

(2) D-α-アミノ酸酸化酵素反応による酸素消費について

天然産アミノ酸はほとんどL型立体配置であるが、D型のものも存在し、動物体内にとりこまれることもあり得る。ある種の酵素はこの立体配置に極めて敏感で、特定の配置型のみには作用することが知られている。これらの酵素のうち、FADを含むフラビンタンパク質で好気性脱水素酵素類に属するD-α-アミノ酸酸化酵素の酸素消費量測定の可能性を検討した。

a 材料と方法

dd-マウスの肝臓と腎臓, ウシガエルの腎臓については摘出後冷凍保存したものを使用した。ブタ腎臓は肉屋より購入し, 冷凍保存して使用した。

＜粗酵素液の調製＞ 塩酸でpH8.3に調整した氷冷0.01Mピロリン酸緩衝液を材料とともにその10倍量加え, 前記ホモジナイザーにて10%ホモジネイトとし, 次に600Gにて10分間遠心してその上清を取り, 粗酵素液とした。

＜反応容器の調製＞ 主室には粗酵素液4ml入れた。阻害実験の場合はさらに NaN_3 溶液0.5ml加えた。側室には基質液として, 0.5M D-アラニン溶液, 0.5M D-L-アラニン溶液, 0.1M L-ロイシン溶液をそれぞれ0.5mlあて入れた。またFADは100r/ml, 0.5ml加えて終濃度は10r/mlとした。セーターウエルには20%KOHを0.3mlもちいた。なお反応溶液の総量は蒸留水で調整して5mlとした。

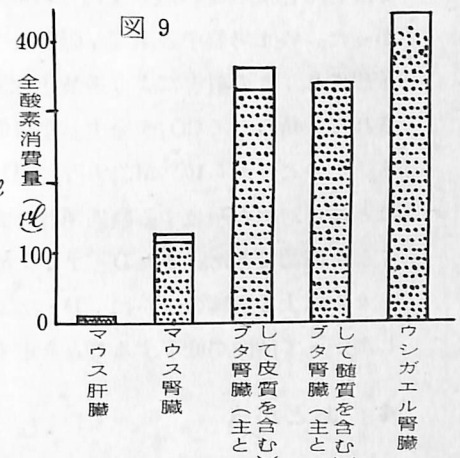
b 結果と考察

＜粗酵素液による酸素消費について＞ マウス肝臓と腎臓(全体ブタ腎臓(主として皮質を含む部分), ブタ腎臓(主として髓質を含む部分), ウシガエル腎臓(全体)の各々の粗酵素液に終濃度 5×10^{-2} MのD-L-アラニンを基質とし, さらに終濃度10r/mlのFADを加えた場合の全酸素消費のようすを図9に示した。マウス肝臓の酸素消費量は非常に低いことから, これは本実験には不適当な材料といえる。マウス腎臓ではある程度測定できよう。

これに対してブタ腎臓とウシガエル腎臓の各分画ではかなり高い酸素消費活性がみられた。ブタ腎臓では皮質部と髓質部とで, ほとんど変わらない消費量が測定された。しかし材料が充分新鮮とはいえず, 自己分解がある程度進んでいると考えられることから, この結果がそのままアミノ酸酸化酵素の腎臓内分布をあらわしているとは断定できない。図9, 棒グラフ打点部分は, D-L-アラニンのみ添加の場合で60分あたりの全酸素消費量を示し, 白色部はさらにFAD添加した場合の60分あたり酸素消費増加分を示したものである。ブタ腎皮質粗酵素液で, 基質アラニンのみの添加でFAD添加時に近い酸素消費をみることができることから, 粗酵素液中におよそ充分の補酵素となり得るFADが存在していることを示している。しかしFAD添加により, 多少とも消費増加分がみられることは, 本酵素の補酵素としてのFADの役割を理解する事例の一つと思われる。

粗酵素液を使用しているので, カタラーゼが含まれており, したがって還元型FADの分子状酸素との反応で生じた過酸化水素が完全に分解されているとすれば, カタラーゼ作用で生じた1/2相当量の酸素が発生し, 測定される酸素消費量は相殺されて実際の1/2量と考えられる。しかし生成された過酸化水素がどの程度分解されているのか確認できず, これらの点に関しては不明である。

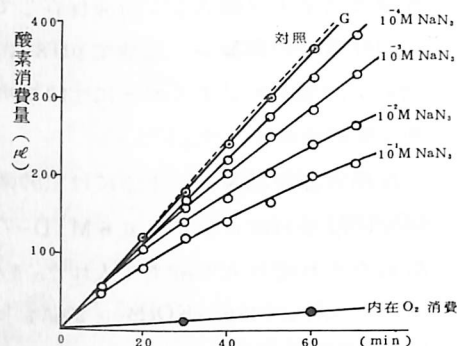
＜D型およびL型アミノ酸を基質とした場合について＞ ブタ腎皮質粗酵素液の内在酸素消費は約4 μl /10minと低い値であった。この粗酵素液にD-アラニン(終濃度 5×10^{-2} M)とFADを添加した場合, D-L-アラニン(終濃度 5×10^{-2} M)によるそれと90分以上等しい酸素消費速度を示した。反応後, ネスラ



一試薬滴下によりアンモニア生成されていたことを確かめることができた。またL-ロイシン(終濃度 $1 \times 10^{-2} M$)を基質とした場合は、内在酸素消費量以上には消費がみられなかった。これらのことより、この粗酵素液による酸素消費はD- α -アミノ酸酸化酵素作用によるものと考えられた。またこのことは、酵素のあるものは厳密な立体特異性をもっていることの事例となるであろう。

<NaN₃添加実験について> D-アミノ酸酸化酵素は金属酵素ではないのでNaN₃による阻害をうけない筈であろうとの予想のもとで、ブタ腎皮質粗酵素液にD-L-アラニンを基質とし、CO₂吸収せずにそれぞれ終濃度 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ になるようNaN₃を加えた。得られた結果は、それぞれNaN₃濃度に応じて、対照に対して低い値を示した(図10)。この効果はFAD添加してもほとんど変わらないから、内在FAD変化の影響とは考えられなかった。いま考察中の系で、阻害を受けるものはカタラーゼと予想され、この阻害により過酸化水素が蓄積し、生成物の1つである α -ケト酸や内在有機酸類が酸化されて、新たにCO₂が発生した可能性があった。もしそうなら見かけ上酸素消費は減少することになる。このことから $10^{-2} M$ 阻害群に対してCO₂吸収を試みたところ、予想通りグラフGで示したごとく、ことを確認できた。またD-アミノ酸酸化酵素はNaN₃で阻害されないことが確かめられた。

なお以上の実験のほかに、D-アミノ酸酸化酵素はpH8.3付近が最適pHであり、これから離れるにしたがって活性が低下することなども実験できよう。



(図10)

4 あとがき

小・中学校では、生物体に入出入りする気体を定性的にとらえたり、個体レベルの気体交換量を測定する実験がなされている。高等学校では組織や、無細胞系における呼吸のしくみを探求しなければならぬ。森川はミトコンドリア分画の呼吸量の測定などから、細胞の呼吸の問題にせまっていく方向を示唆している(高校, 改訂指導要領の展開, 1971)。

呼吸過程の一部がみられるミトコンドリア分画の酸素消費をかなり定量的に小林の装置で測定することが可能であった。また酵素作用一般に関する実験では、従来、消化酵素などが多くとりあげられているが、カタラーゼや、本実験で選んだD- α -アミノ酸酸化酵素のようにガス収支をとまなうものについては、同様に小林の装置でその作用の定量化ができることを確かめた。生徒実験により、この種のデータが得られれば、分析や比較検討の議論を通して生命の基本素過程の原理的理解に役立つものとなるだろう。

文 献

- (1) 篠原尚文 科学の実験 vol 23, No 5, 93
- (2) 竹内 清 生物実験の定量化 学習研究社, 51
- (3) C. Kobayashi Journ. Biochem. 24, 381 (1936)
- 赤堀四郎編 酵素研究法 朝倉書店 vol 2, 455, 495
- 日本生物物理学会編 細胞器官研究法 1 吉岡書店, 93
- 児玉桂三編 生物化学ハンドブック 技報堂, 218